

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-153260

(P2002-153260A)

(43) 公開日 平成14年5月28日 (2002.5.28)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>C 12 M 1/34  
1/00  
1/12  
1/26  
1/38

識別記号

F I

C 12 M 1/34  
1/00  
1/12  
1/26  
1/38チ-ヨ-ト<sup>8</sup> (参考)A 4 B 0 2 9  
D

Z

審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2000-356827(P2000-356827)

(22) 出願日

平成12年11月22日 (2000.11.22)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 安田 賢二

東京都江東区潮見2-8-14-1014

(72) 発明者 金子 邦彦

神奈川県藤沢市藤ヶ岡2-7-22

(72) 発明者 四方 哲也

大阪府豊中市新千里東町2-4-D3-

106

(74) 代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

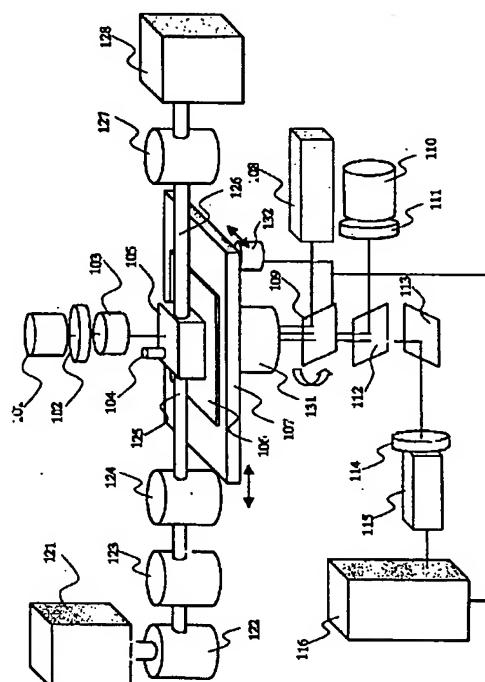
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 一細胞長期培養顕微観察装置

## (57) 【要約】

【課題】 特定の一細胞に由来する細胞群を培養することや、細胞を培養する過程で相互作用させる細胞を特定しながら培養観察すること、細胞濃度を一定にしたまま細胞を培養する培養している細胞群の中の特定の細胞のみにシグナル物質等の薬剤などの細胞と相互作用する物質を散布し、その細胞と他の細胞との変化の違いを観察すること等を可能とする新しい技術手段を提供する。また、特定の状態にある細胞のみを回収し、その細胞の遺伝子、発現mRNA等の解析、あるいは生化学的測定を行うことを可能とする新しい手段を提供する。

【解決手段】 基板状に設けた穴からなる細胞培養部と、細胞培養部の上面を覆う半透膜と、半透膜上部に設けた培養液交換部を有する細胞培養容器を備え、細胞培養容器への細胞培養液の供給手段と、細胞培養部内の細胞を長期観察することのできる顕微光学手段を具備しているものとする。



(2) 002-153260 (P2002-153260A)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 基板上に設けた穴からなる細胞培養部と、細胞培養部の上面を覆う半透膜と、半透膜上部に設けた培養液交換部を有する細胞培養容器を備え、細胞培養容器への細胞培養液の供給手段と、細胞培養部内の細胞を長期観察することのできる顕微光学手段を具備していることを特徴とする一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項2】 細胞培養部の穴の径は1マイクロメートル以上、1mm以下、深さは100マイクロメートル以下であることを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項3】 容器は光学的に透明な材質でできていることを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項4】 半透膜は、アビシンおよびビオチンを用いた結合によって基板の上面に固定されていることを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項5】 半透膜は分子量10000以上、0.2マイクロメートル以下のポアサイズの光学的に透明な半透膜であることを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項6】 細胞培養部の穴は少なくとも2つ以上基板の上面に設けられていることを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項7】 細胞培養部の穴が、細胞が通過できる基板上面に設けられた流路によって別の穴に連通されていることを特徴とする請求項6の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項8】 細胞培養容器には廃液排出手段が具備されており、培養液供給手段より培養液交換部に供給される培養液が半透膜を介して細胞培養部穴内の廃液と交換され、廃液が廃液排出手段により排出されるようにしたことを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項9】 容器には容器内に残留した気体を排出するための弁が配設されていることを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項10】 培養液の温度を制御するための手段が具備されていることを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項11】 細胞を捕捉し、移動させる手段を具備することを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項12】 細胞を捕捉し、移動させる手段として光ビンセット手段を具備することを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項13】 細胞を捕捉し、移動させる手段として超音波を用いる手段を具備することを特徴とする請求項11の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項14】 細胞を捕捉し、移動させる手段として

電場を用いる手段を具備することを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項15】 細胞培養部の穴に試薬を散布し、試薬を回収するピペットを具備することを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項16】 顕微光学手段の光路上にフィルターを入れることにより、細胞を蛍光観察できるようにしたことを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項17】 画像データを取得する手段と、画像データにより特定の細胞の形状を認識する手段と、特定の細胞を視野の中央に維持するためにステージの位置、対物レンズの焦点深度を制御する手段とを有することを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項18】 細胞培養部の穴の中の細胞数を計測する手段を有することを特徴とする請求項1の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項19】 細胞培養部の穴の中に半透膜を貫通して導入でき、穴内部の特定の細胞を回収したり、あるいは、試薬や封入材を注入するピペットを具備することを特徴とする請求項1または15の一細胞長期培養顕微観察装置。

【請求項20】 請求項1ないし19のいずれかの装置を用いて細胞を長期観察することを特徴とする一細胞長期培養顕微観察方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は一細胞長期培養顕微観察装置に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、微生物や細胞を用いたバイオテクノロジーの研究分野において、特定の細胞の状態を顕微鏡観察しながら、1細胞単位で培養することのできる、細胞の長期培養顕微観察装置とこれを用いた方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来の生物学、医学、薬学の分野では、細胞の状態の変化、あるいは細胞の薬物等に対する応答を観察するのに、細胞集団の値の平均値をあたかも一細胞の特性であるかの様に観察してきた。しかしながら、実際には細胞の集団の中で細胞周期が同調しているものはまれであり、各々の細胞が異なった周期でタンパク質を発現している。これらの問題を解決するべく、同調培養の手法が開発されているが、培養された細胞の由来が全く同一の一細胞からではないことから、培養前の由来細胞各々の遺伝子の違いがタンパク質発現の違いを生み出す可能性があり、実際に刺激に対する応答の結果を解析するときに、そのゆらぎが細胞反応機構自体が普遍的に持つ応答ゆらぎに由来するものなのか、細胞の違い（すなわち遺伝情報の違い）に由来するゆらぎなのか明らかにすることは難しかった。また、同様の理由から細

(3) 002-153260 (P2002-153260A)

胞株についても、一般には完全に一細胞から培養したものではないため、刺激に対する応答の再現性が細胞各々の遺伝子の違いによってゆらぐものか明らかにすることは難しかった。さらにまた、細胞に対する刺激（シグナル）は、細胞周辺の溶液に含まれるシグナル物質、栄養、溶存気体の量によって与えられるものと、他の細胞との物理的接触によるものの2種類がある。従来、バイオテクノロジーの研究分野において細胞の観察を行う場合は、大型培養器にて培養された細胞群の一部を一時的に培養器から取り出して顕微鏡にセットし、観察を行っていた。あるいは、顕微鏡全体をプラスチックの容器で囲い温度を管理し、その中に小さい別の容器を用い二酸化炭素濃度、及び温度を管理しつつ、顕微鏡観察を行っていた。このとき、細胞を培養しながら、古くなった培養液と新鮮な培養液を交換することで溶液条件を一定にする方法として多数の提案がなされている。たとえば特開平10-191961に開示されている方法では、循環ポンプが、基材表面に対する培地のレベルを基材の上端縁高さより高いレベルと下端縁高さより低いレベルとの間で上げ・下げ操作し、上記低レベルに下がると培地を供給し、上記高レベルに上がると培地を排出する機構によって栄養状態を一定に保っている。また、特開平8-172956では、培養容器内に、新たな培地を培養容器に導入する導入管と、培養容器の培地を外部に排出する排出管と、培養容器の気体部分とポンプとを連通する気管の各一端を挿入し、前記導入管、排出管及び気管の夫々の管路に培養容器内への菌の侵入を阻止するフィルターを設けており、培養槽の栄養状態を一定に保つ構成になっている。

【0003】しかし、これらの提案にもかかわらず、培養細胞の溶液環境と、細胞間の物理的接触を制御しながら培養する方法は知られていない。また、培養する場合、特定の一細胞のみを選択し、その一細胞を細胞株として培養する技術は知られていない。そして、細胞を観察する場合に、細胞の溶液環境条件を制御し、かつ、容器中での細胞濃度を一定に制御する技術、あるいは相互作用する細胞を特定しながら培養観察する技術も知られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】以上のことから明らかなように、従来の技術では、細胞の培養を行う場合、細胞群から培養を開始するため、完全に同一の遺伝子を持つ細胞株ではなかった。また、従来の技術では、培養を行うときに特定の細胞同士を選別し、その相互作用あるいは濃度を制御しながら培養を行うことは難しかった。さらに、従来の技術では培養槽の培養液を交換することで溶液環境を一定に保つ工夫をしていたが、培養槽内で培養中の特定の細胞の環境を速やかに変化させ、その応答を観察することは難しかった。

【0005】そこで、この出願の発明は、以上のとおり

の従来技術の問題点を解消し、特定の一細胞に由来する細胞群を培養することや、細胞を培養する過程で相互作用させる細胞を特定しながら培養観察すること、細胞濃度を一定にしたまま細胞を培養している細胞群の中の特定の細胞のみにシグナル物質等の薬剤などの細胞と相互作用する物質を散布し、その細胞と他の細胞との変化の違いを観察すること等を可能とする新しい技術手段を提供することを課題としている。また、この出願の発明は、特定の状態にある細胞のみを回収し、その細胞の遺伝子、発現mRNA等の解析、あるいは生化学的測定を行うことを可能とする新しい手段を提供することを課題としている。

【0006】

【課題を解決するための手段】この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、基板上に設けた穴からなる細胞培養部と、細胞培養部の上面を覆う半透膜と、半透膜上部に設けた培養液交換部を有する細胞培養容器を備え、細胞培養容器への細胞培養液の供給手段と、細胞培養部内の細胞を長期観察することのできる顕微光学手段を具備していることを特徴とする一細胞長期培養顕微観察装置を提供する。

【0007】そして、上記の装置について、構成上の形態の特徴についてもこの出願の発明において提供している。たとえば、この出願の発明の上記の一細胞長期培養顕微観察装置では、顕微観察系の光路上に小さな培養容器を配置し、前記容器内部は、細胞を培養するための小さな穴からなる細胞培養部と、穴から細胞が出ないようにその上面を被覆する細胞が通過できない程度の目の粗い光学的に透明な半透膜と、その上面は培養液が循環する溶液交換部液交換部で構成される。また、細胞培養部は1つあるいは複数の幅数 $\mu$ mから数百 $\mu$ m程度の小さな穴からなり、その穴に目的細胞を誘導し培養する手段を有している。ここで細胞培養部では液循環部からの拡散により細胞が成長するのに必要な栄養や酸素が液交換部より常に細胞に供給され排泄物あるいは分泌物は逆に取り除かれる手段と、光学的に細胞を観察する手段を有している。また、光ピンセット等の非接触捕獲技術および各穴の間に作られた運搬路により、細胞培養部の各穴の細胞数、穴の中の細胞の種類を制御する手段を有している。

【0008】また、この出願の発明の装置では、ベルチエ素子等の温度制御手段によって、前記容器内部の液温を制御する手段を有し、さらに本発明は、培養液溜めより液交換部に培養液を送り出す送液管に脱気セルや気体置換セル等の脱気手段を配置し、培養液の溶存気体の種類および濃度を自由に制御できる手段を有する。

【0009】さらにまた、この出願の発明の装置では、ピペット等の先端を特定の穴の上面に誘導して薬剤等を散布することで、半透膜を隔てた特定の穴の中の細胞のみに薬剤の影響を与える手段や、ピペット等によって上

(4) 002-153260 (P2002-153260A)

記半透膜を貫通し、特定の穴から特定の一細胞を抽出する手段を有し、また、同様にピペット等によって特定の穴に封入剤等を導入する手段を有する。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】この出願の発明は、上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下に、その実施の形態について説明する。

【0011】まず、明確にしておかねばならないことは、この出願の発明において規定されている「一細胞」との表現は、一細胞のみを取扱うということに限定されではない。細胞培養部の穴においては複数個体の細胞が培養されてよいのであって、この出願の発明が特徴としていることは、このような複数個の培養であっても、単一の特定の細胞の培養経緯等を制御し、かつ観察することを可能としていることにある。「一細胞」との規定はこのことを意味している。

【0012】また、「長期」との規定についても、絶対的基準として理解されるものでなく、個々の細胞の種類に応じた相対的な規定であって、しかも、従来の方法に比べてより長期での培養経緯等の制御と観察が可能とされていることとして理解されるべきである。

【0013】この出願の発明においては、以上のことが前提とされている。図1は、この出願の発明の長期培養顕微鏡観察装置の基本構成の一例を示したものである。この図1に沿って説明すると、この出願の発明の長期培養観察装置は、微生物や細胞を培養し、その培養液を交換できるようにした培養容器105を備えている。そして、この培養容器105内に送られる培養液の成分や温度、雰囲気、気体の種類、濃度等を調節しながら培養液を提供する培養液の供給・廃棄系と、培養容器105内の細胞を経時的に観察し、ビデオやパソコン等に記録する顕微観察光学系を備えている。

【0014】より具体的に例示説明すると、細胞が培養される培養容器105には、容器内に残留した空気等の気体を排出するための気体排出弁104が設けられており、培養容器105が培養液で満たされる構造になっている。培養容器105の底面の大きさは顕微観察に適した大きさである。また、この培養容器105は、ステージ107の上に乗っている。

【0015】培養液供給・廃棄部について説明すると、培養容器105に複数の種類や、濃度の異なる培養液を供給する機能を有する培養液供給装置121から供給された培養液はまずヒーター122により液温調節され、チューブにより導かれて溶存気体交換装置123により空気等の溶存気体の成分が調整される。次いでポンプ124により流速を調節され、チューブ125を介して培養容器105に送られる。

【0016】培養容器105には、もう一つのチューブ126が配置されており、培養容器105内の溶液はチューブ126を通り廃液溜め128にポンプ127の吸

引により送られる。ここで、ポンプ124とポンプ127は、観察するときには同じ流速で培養容器105の培養液の供給と排出を行うが、気体排出弁104が閉じた状態では、ポンプ124とポンプ127のいずれか一方を省略することができる。廃液溜め128にはヒーターが取り付けられて培養液の温度を調節できるようにし、ポンプによりチューブを通して培養液溜めに空気等を送ることにより、培養液中の空気を飽和した状態にすることもできる。

【0017】廃液溜め128には培養液溜めをチューブにより連結し、弁を開閉することによって培養液を培養液供給装置121等の供給装置に循環させることもできる。この場合、チューブの途中にフィルターを配設して廃液中の余分な成分を除去するようにしてもよい。

【0018】図1に示された基本構成での光学系では、上下二方向より試料を照射することができるようしている。上部の光源101より照射された光は、フィルター102により特定の波長に調整されコンデンサレンズ103によって集光されて、培養容器105に照射される。照射された光は、透過光として対物レンズ131での観察に用いられる。培養容器105内部の透過光像は、ミラー113によってカメラ115に誘導され、カメラの受光面に結像する。従って、培養容器105および培養容器底面で実際に細胞を培養する細胞培養部基板106の素材は、光学的に透明な素材であることが望ましい。具体的には、ホウケイ酸ガラス、石英ガラス等のガラスや、ポリスチレン等の樹脂やプラスチック、あるいはシリコン基板等の固体基板を用いる。また、特にシリコン基板を用いる場合は波長900nm以上の波長の光を観測に用いる。下部の光源110より照射された光はフィルター111により波長選択された後に、ダイクロイックミラー112によって対物レンズ131に誘導されている。培養容器105内部の蛍光観察の励起光として用いられる。培養容器105から発した蛍光は再度対物レンズ131によって観測され、フィルター114によって励起光をカットした後の蛍光と透過光のみをカメラ115で観察することができる。このとき、フィルター102、111、114の組み合わせを調整することで、透過光のみをカメラ115で観察したり、あるいは蛍光のみを観察したり、透過光像と蛍光像を同時に観察することもできる。光路内には、レーザー光源108で発生させたレーザー光を可動ダイクロイックミラー109によって対物レンズ131に導入する機構も備わっている。このレーザーを光ピンセットとして用いる場合には、可動ダイクロイックミラーを移動させることで、培養容器105内でのレーザーの集束位置を動かすことが可能である。また、カメラで得られた画像データは画像処理解析装置116によって解析され、その他培養容器105に付属した温度計測器の温度を観測した結果などさまざまな解析結果を基に可動ダイクロイックミラー

!(5) 002-153260 (P2002-153260A)

109や、培養容器105が載っている温調機能付ステージの位置を制御するためにX-Y-Z方向に自在に移動させるステージ移動用モーター132を駆動することができる。これによって細胞の形状を認識したり、認識後にその細胞を追跡し、つねに画像の中心に位置させたり、対物レンズとの距離を調節することで画像のピントを特定の細胞に合わせたりすることが可能である。あるいは、一定時間の周期で可動ダイクロイックミラー109や、培養容器105が載っている温調機能付ステージ107を制御したり、一定間隔でステージ移動用モーター132を駆動することが出来る。

【0019】図2は、図1に例示した培養容器の配置を例示したものであり。図3および図5は、この図2のA-A断面を例示したものである。この図2に示した培養容器202には、前記と同様に、気体排出弁201、培養液供給のためのチューブ203と廃液の排出のためのチューブ204が設けられて、また培養容器202の底部には、図1における細胞培養部基板106と同じ、細胞培養部基板205が配設されている。

【0020】培養容器202については、たとえばガラス製とすることができるが、ガラス以外にも、ポリプロピレン、ポリスチレン等の樹脂製であって、光学的に透明な各種の容器を用いることができる。

【0021】また、シリコン基板等の固体基板を用いて波長900nm以上の近赤外光で観察することもできる。図3の断面図は、細胞培養のためのこの出願の発明の培養容器とこれに備えられた構成について例示している。

【0022】前記図1の培養液供給装置121から送液された培養液は、図3のチューブ302を介して培養容器301の液交換部301Aに溜められる。そして、この液交換部301Aに溜められた新鮮な培養液は、細胞培養部306内の古くなった培養液と半透膜304を介して交換される。

【0023】細胞培養部306は、基板305に設けた複数の穴によって構成されている。この穴の上面には半透膜304がシールされている。従って穴306内に封入された細胞は、この穴から出ることができず、また培養液部からバクテリア等の雑菌が入らないような構成になっている。

【0024】この穴の大きさは、細胞1個の大きさよりも大きいことが必要である。従って、細胞を培養する場合は、細胞の大きさにもよるが、一般にその大きさはたとえば、その開口径が3mm以下で、深さが300μm以下とすることができます。より好ましくは、この出願の発明の所期目的の効果的な達成のためには、開口径が1μm～1mmの範囲、さらに好ましくは10μm～50μmの範囲にあるものとし、深さが100μm以下とする。また、これらの開口径と深さは培養する細胞の大きさ、種類によって適宜に調節される。

【0025】また培養容器301の液交換部301Aの高さについても、培養液の拡散を考えると、穴の深さよりも大きいことが望ましい。そしてまた細胞培養部基板の厚みは、100倍の対物レンズを用いて顕微観察、光トラップを行う場合には、開口数の高い対物レンズを用いることから、肉厚の薄い基板を用いる必要がある。たとえば基板がホウ珪酸ガラスである場合、0.3mm以下の厚さの基板を用いる必要がある。

【0026】細胞培養部306を構成する穴は、前記のとおり複数あってよく、この穴の中で、目的とする細胞が培養されることになる。培養液の廃液は、液交換部301Aよりチューブ303により抜き出されることになる。細胞培養部306の穴は、その深さが非常に浅いので、培養液の交換は速やかに行われ、チューブ303より古い培養液が排出されることになる。

【0027】半透膜304については、細胞が通りぬけられず、外界のバクテリア等が入らない程度の大きさの微細孔を持つものとする。この出願の発明においては、より具体的には、半透膜は、分子量MW10000以上で、0.2μm以下のボアサイズの光学的に透明なものであることが好ましい。

【0028】半透膜304は、上記のように、細胞が通りぬけられない程度のボアサイズを有していることから、培養容器301の液交換部が301Aから雑菌が入ってくることも、細胞培養部306の穴から細胞が液交換部301Aに流れ出してしまふこともない。

【0029】基板305と培養容器301とは、たとえば図3に例示したように、シリコンシール等の接着シール307によって密着させる。これによって、液交換部301Aから培養液が漏れ出ることが防止される。そして、細胞培養部306の穴の上部以外では、基板305に対して、半透膜304が密着シールされて隙間がないようにする。これは、細胞培養部306が複数の穴によって構成される場合、一つの穴と別の穴の間で細胞が移動することができないようにするためである。

【0030】このような基板305と半透膜304との密着のための手段としては、たとえばアビシンとビオチンとの結合を利用した方法が有効である。図4はこの結合を例示した概要断面図である。半透膜401としてセルロース膜を、細胞培養部の基板402にガラスを用いた場合、半透膜401と基板402との間では、半透膜401の-OH基を部分的に-CHO基に変換し、これをアミノ基が修飾されたビオチンと-(CO)-NH-結合させる。このようにして半透膜401表面にビオチン404が修飾される。他方、ガラス基板402表面にシランカップリング剤によりアミノ基を表面に修飾し、その後、-CHO基を持ったビオチンと反応させることで、半透膜と同様に基板402表面にビオチンを修飾することができる。ここでアビシン403を添加し、ビオチン-アビシン結合で細胞培養部基板402に半透膜4

!(6) 002-153260 (P2002-153260A)

01を接着させる。

【0031】このようにして、細胞培養部405の穴の部分を除いて、半透膜401と基板402の各々の表面に結合配設したビオチン(404)が、アビジン403を介して相互に結合して密着するようにしている。これに優れたシール効果が実現される。

【0032】図5は、基板501に設けた細胞培養部502の穴での細胞503の培養の状況を例示した概要図である。この出願の発明による培養によれば、たとえば60倍の対物レンズを使用した場合でも、通常のアレバートと同様に、位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡、蛍光顕微鏡で、細胞培養部502の穴の中の細胞503を観察することができる。なお、図5においては、半透膜504も示されている。

【0033】また、図5では、楕状の穴を例示しているが、その形状は、方形、多角形等の各種であってよい。細胞培養部としての穴は、たとえば図6のように均一ないしは略均一の大きさのものとして、基板601上に、複数の細胞培養部602として所定の等間隔のパターンで配置させることができる。また、図7のように、基板701上に大きさが段階的に異なる穴としての細胞培養部702、703、704、705、706を設けてもよい。図8は、この大きさの異なる細胞培養部802、804の穴での細胞803、805の培養の状況を例示した概要図である。このとき、ともに穴内の細胞数は1であるが細胞数を穴の容積で割った細胞濃度は異なる。このように穴の容積をコントロールすることで同一の細胞数で、異なる濃度での細胞の反応を観察することができる。

【0034】そして、細胞培養部としての穴の配置パターンや配置数、さらには穴の大きさやその形状については適宜に定めてよいことは言うまでもない。この出願の発明によれば、たとえば細胞培養部の穴の大きさ(直径)を変えることにより目的対象としている細胞の平均自由行程の大きさを変えたり、同じ大きさ(直径)の穴に入れる目的対象細胞の数を変えることにより細胞密度を変化させたりすることが可能となる。また、細胞培養のための穴の形状を変えて、その形状の細胞に与える影響、効果を観察することもできる。

【0035】また、この出願の発明によれば、たとえば図9に例示したように、ガラス等の基板901に、細胞培養部902としての複数の穴と、この穴を連結し、細胞1個がからうじて通ることのできる細い流路としての溝903を、基板901の表面に設けてもよい。この流路としての溝903を設けることにより、たとえば細胞の移動速度や走行性等を測定することができる。あるいは光ピンセット等の微粒子捕捉手段を用いて、流路を介して細胞を隣接した別の細胞培養部穴に移すことができる。光ピンセットを用いることで、細胞を分離、選択したり、穴の中で特定の細胞同士を相互作用させたり、穴

の中の細胞数を制御することが可能である。

【0036】図10は、このような細胞移動の操作を例示した平面概要図である。基板1001には、細胞培養部1002としての穴と、これらを連結する流路としての溝1003を設け、細胞培養部1002の穴Aから別の穴Bに、光ピンセット1005手段によって細胞1004を溝1003を通して移動可能としている。この場合の光ピンセット1005手段は、これまでによく知られている手段であって、レーザー集束光を対象細胞に照射することによって細胞を捕捉し、捕捉した状態のまま、レーザー集束光の移動により細胞を移動可能とする手段である。

【0037】このような光ピンセット1005の手段によれば、たとえば図11に例示したように、基板1101に設けた細胞培養部1102の穴と、細胞溜め1104の穴とを流路としての溝1103で連通させて構造において、細胞溜め1104の穴から特定の細胞を光ピンセットにより細胞培養部1102の穴にもってくることができ、逆に細胞培養部1102の穴から、細胞溜め1104の穴へ特定の細胞を移行ないし捨てることもできる。あるいはまた、図12に例示したように、細胞培養部基板1201上に、1細胞精製培養系を組むこともできる。この場合は、まず、試料導入部1202に細胞を外部から導入し、この中の1細胞を光ピンセット等の捕捉手段を用いて溝を移動させ、細胞培養用穴1204に誘導する。この溝の途中には細胞トラップ用穴1203が置かれており、1202から細胞が泳いで穴1204に進入するのを防いでいる。次に、穴1204で1細胞から培養され増殖した細胞群から、再び特定の状態の細胞1つを取り出し、これを同様に捕獲手段を用いて溝を移動させて、第2の培養用穴1206に誘導する。途中には、同様に細胞トラップ用穴1205がある。穴1206で培養された細胞は、増殖してある一定の状態になったとき、細胞観察用穴1208に、細胞運搬用溝1207を経て運搬され、観察等がなされる。

【0038】図13は、図2で示した実施例とは異なる別の培養容器の一例を示したものである。この例では、外部からビベット1307を導入して、半透膜1304を貫通させ、穴1306中の細胞を選択的に回収する。そのため、培養容器1301は上面が開放されており、容器中に満たされた培養液1313の上にはミネラルオイル1312を張ることで、雑菌の混入を防いでいる。チューブ1302を通じて矢印1311の方向の流れで導入される培養液の量は、矢印1317の方向に吸引される溶液の量より少なくなっている。液面高さ調節部1315を用いることで、この液面高さが溶液出口1316より低くなると、空気が吸引され溶液の吸引が止まり、液面の高さが上がって出口1316を塞ぐと再び培養液が吸引され、結果として液面の高さが一定に保たれる。この例では、液面高さ調節部を培養容器105とは

!(7) 002-153260 (P2002-153260A)

別途設置することにより、液面の波紋が光学観察に影響を与えないようにしている。ここでピペット1307は、細胞を吸引するために用いることも出来るが、特定の穴や溝を塞ぐために、充填剤を注入したり、特定の細胞を半透膜を貫通して細胞培養部に導入することに用いる事もできる。たとえば、図12で示した1細胞精製培養系の試料導入部1202に特定の試料を導入する場合に用いることができる。このときは、ピペットによって導入された細胞は、他の細胞等が半透膜の破れから侵入する前に、光ピンセット等の捕獲手段によって、半透膜でシールされた穴まで溝を通って動かせば、コンタミの問題なく実験することが出来る。また、本実施例でピペット1で1細胞単位で特定の状態の細胞を回収できることから、この1細胞の遺伝子多型解析、mRNA発現解析等も行うことが出来る。

【0039】図14は、特定の穴1402中の細胞に、誘導等をかけるため試薬を導入する実施例を示している。この場合のピペットは二重構造をしており、内側のピペット1411から溶液を放出し、外側のピペット1412から吸引を行う。これによって、内側のピペット1411から放出された溶液は、その出口近傍にのみ分布し、外側のピペット1412からの吸引によって、外側のピペット1412から外の領域には溶液が漏れ出ない構造になっている。したがって、このピペットを特定の穴の近傍に持ってゆくことで、特定の細胞のみに作用を与えることができる。

【0040】なお、この発明の前記のとおりの光ピンセット等の捕捉移動の手段による細胞の移動で、細胞培養部の穴内での特定細胞の濃度を制御することや、相互作用する細胞の特定、相互作用期間の制御等が可能となるが、細胞の捕捉と移動のための手段は、上記の光ピンセットに限られることはない。たとえば超音波を用いる手段であってもよいし、電場を利用する手段であってもよい。

【0041】図15には、細胞培養部基板1501に複数の電極1501、1505、1508を導入した実施例の一つを示している。細胞は溶液中でその表面状態に応じて、特異的な電荷を持つことから、たとえば電極1502に正の電荷を印加すると、反対の電荷を持つ細胞1511を穴1503まで引き寄せることができる。この手法を用いることで、穴1503、1506、1509それぞれに、負の電荷の強さに応じた細胞が集まる事になる。また、電極1505、1508に負の電荷を印加すれば、細胞は各穴の間を移動することができなくなる。

【0042】また、図16には、細胞培養部基板1601に電極1602、1603を配置し、超音波振動子1604、1605を配置した実施例の一つを示している。この例では、細胞を操作する非接触力として電界1611、超音波輻射圧1612を用いている。電界は細

胞の持つ表面電荷に応じた外力を細胞に与え、また、超音波輻射圧は細胞のサイズおよび硬さに応じた外力を細胞に及ぼす。このとき用いる超音波の振動数は超音波による気泡（キャビテーション）発生を抑制するため1MHz以上の周波数を用いることが望ましい。この実施例では、具体的に、超音波輻射圧と電場を互いに直交する異なる方向に作用させることで、細胞の持つ電荷とサイズに応じた細胞分布を2次元に展開することができる。また、この例では電界による外力と超音波による外力を1つの基板上で組み合わせることで細胞の種類に応じた分離を行ったが、電界、超音波による外力をそれぞれ単独で用いて細胞の運動に用いても良い。これによって光ピンセットで用いたような細胞ハンドリングが可能である。

【0043】そして、この出願の発明においては、細胞培養部としての穴中の細胞数を計測する手段を備えることができ、さらには、細胞培養部の穴に、半透膜を貫通して導入でき、穴内部の特定の細胞を回収したり、あるいは、穴内に試薬や封入材を注入もしくは回収することのできるピペットを備えることもできる。その他細部の実施上の形状については以上の例示説明に何ら限定されることなしに、各種各様のものが可能とされることは言うまでもない。

【0044】たとえば以上のとおりのこの出願の一細胞長期培養顕微観察装置においては、たとえば次のような優れた効果が得られることになる。

(1) 特定の細胞を隔離し、長時間観察することができる。

【0045】(2) 培養液の種類、温度を培養途中に自由に変えることができる。

(3) 培養する容器の容積、形状を自由に設定することができる。

(4) 培養する細胞の数を培養途中に正確に制御することができる。

【0046】(5) 培養している容器に他の雑菌は入ってこない。

この出願の上記装置を用いることにより、たとえば図17に例示したように、大腸菌の成長観察においては、各世代間での成長速度、分裂する長さに差なく、2倍の長さになると分裂することが確認される一方で、図18のように、成長には細胞培養部の穴の大きさ、つまり容積への依頼性が確認された。図18で、 $l_{large}$ は $2 \times 10^{-7} m$ を、 $small$ は $2 \times 10^{-9} m$ を示している。

【0047】また、図19のように、世代による分裂時間と、初期菌数による分裂時間には相違があり、1回目の分裂では分裂開始に時間がかかり、1細胞の場合には複数細胞の場合よりも分裂開始に時間がかかることが確認された。

【0048】このようなことは、一細胞レベルでの長期培養と顕微観察を可能とするこの出願の発明の装置と方

(8) 002-153260 (P2002-153260A)

法とによってはじめて可能とされるのである。

【0049】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、従来技術の問題点を解消し、特定の一細胞に由来する細胞群を培養することや、細胞を培養する過程で相互作用させる細胞を特定しながら培養観察すること、細胞濃度を一定にしたまま細胞を培養する培養している細胞群の中の特定の細胞のみにシグナル物質等の薬剤などの細胞と相互作用する物質を散布し、その細胞と他の細胞との変化の違いを観察することなどを可能とする新しい技術手段が提供される。また、この出願の発明により、特定の状態にある細胞のみを回収し、その細胞の遺伝子、発現mRNA等の解析、あるいは生化学的測定を行うことを可能とする新しい手段が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の基本構成の一例を示す模式図である。

【図2】図1で示した1細胞培養部の装置構成を示す模式図である。

【図3】図2で示した1細胞培養部のA-A断面を示す模式図である。

【図4】基板と半透膜の接着方法の一例を示す模式図である。

【図5】細胞培養部の細胞捕獲の様子を示す模式図である。

【図6】基板表面の穴の構造の一例を示す模式図である。

【図7】基板表面の穴の構造の一例を示す模式図である。

【図8】図7で示した大きさの異なる基板表面の穴の断面構造を示す模式図である。

【図9】基板表面の穴の構造の一例を示す模式図である。

【図10】光ピンセットを用いて図9で示した穴の間で細胞を運搬する手段を説明する模式図である。

【図11】基板表面の穴の構造の一例を示す模式図である。

【図12】基板表面の穴の構造の一例を示す模式図である。

【図13】細胞培養部の装置構成の一例を示す模式図である。

【図14】細胞培養部の装置構成の一例を示す模式図である。

【図15】基板表面の穴の構造の一例を示す模式図である。

【図16】基板表面の穴の構造の一例を示す模式図である。

【図17】大腸菌の世代間の成長速度、分裂長さの観察結果を示した図である。

【図18】大腸菌の成長についての容積依存性の観察結

果を示した図である。

【図19】大腸菌の分裂について、世代による分裂時間と、初期菌数による差の観察結果を示した図である。

【符号の説明】

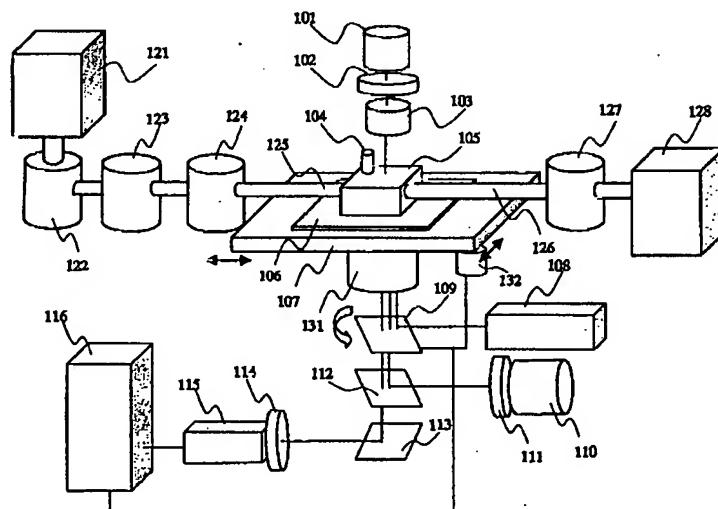
- 101、110 光源
- 102、111 フィルター
- 103、114 コンデンサレンズ
- 104 気体排出弁
- 105 培養容器
- 106 細胞培養部基板
- 107 温調機能付ステージ
- 108 レーザー光源
- 109 可動ダイクロイックミラー
- 112 ダイクロイックミラー
- 113 ミラー
- 115 カメラ
- 116 画像処理解析・記録装置
- 121 培養液供給装置
- 122 ヒーター
- 123 溶存気体交換装置
- 124、127 ポンプ
- 125、126 チューブ
- 128 廃液溜め
- 131 対物レンズ
- 132 ステージ移動用モーター
- 201 気体排出弁
- 202 培養容器
- 203、204 チューブ
- 301 培養容器
- 301A 液交換部
- 302、303 チューブ
- 304 半透膜
- 305 細胞培養部基板
- 306 細胞培養部
- 307 接着シール
- 401 半透膜
- 402 細胞培養部基板
- 403 アビジン
- 404 ピオチン
- 405 細胞培養部
- 501 細胞培養部基板
- 502 細胞培養部
- 503 細胞
- 504 半透膜
- 601 細胞培養部基板
- 602 細胞培養部
- 701 細胞培養部基板
- 702、703、704、705、706 細胞培養部
- 801 細胞培養部基板
- 802、804 細胞培養部

!(9) 002-153260 (P2002-153260A)

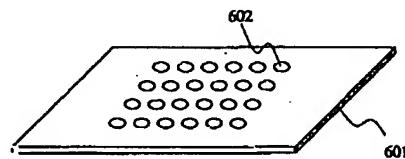
803、805 細胞  
 901 細胞培養部基板  
 902 細胞培養部  
 903 溝  
 1001 細胞培養部基板  
 1002 細胞培養部  
 1003 溝  
 1004 細胞  
 1005 光ピンセット  
 1101 細胞培養部基板  
 1102 細胞培養部  
 1103 溝  
 1104 細胞溜め  
 1201 細胞培養部基板  
 1202 試料導入部  
 1203、1205 細胞トラップ用穴  
 1204、1206 細胞培養用穴  
 1207 溝  
 1208 細胞観察用穴  
 1301 培養容器  
 1302、1303 チューブ  
 1304 半透膜  
 1305 細胞培養部基板  
 1306 穴  
 1307 接着シール

1308 ピペット  
 1311、1314、1317 培養液の流れ  
 1312 ミネラルオイルの膜  
 1313 培養液  
 1315 液面高さ調節部  
 1316 溶液出口  
 1401 細胞培養部基板  
 1402 穴  
 1403 細胞  
 1404 半透膜  
 1411 溶液放出ピペット部  
 1412 溶液吸引ピペット部  
 1413 ピペット放出液の流れ  
 1414 ピペット吸引液の流れ  
 1501 細胞培養部基板  
 1502、1505、1508 電極  
 1503、1506、1509 穴  
 1504、1507 溝  
 1510 細胞の動く方向  
 1511、1512 細胞  
 1601 細胞培養部基板  
 1602、1603 電極  
 1604、1605 超音波振動子  
 1611 電場の向き  
 1612 超音波輻射圧の向き

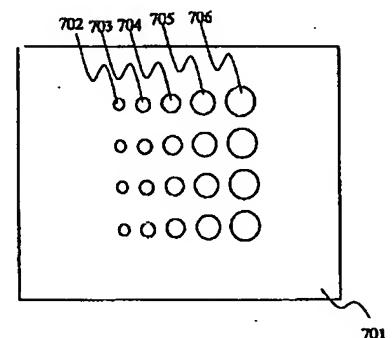
【図1】



【図6】



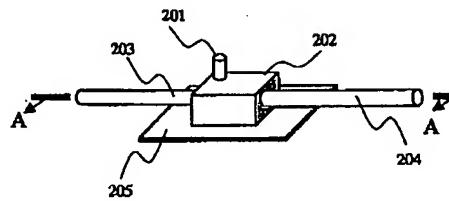
【図7】



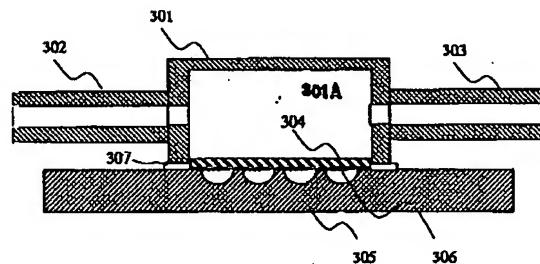
701

(10) 02-153260 (P2002-153260A)

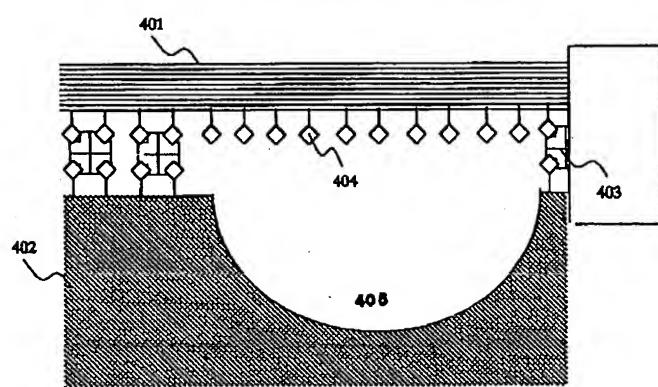
【図2】



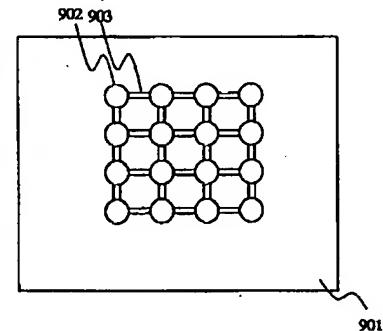
【図3】



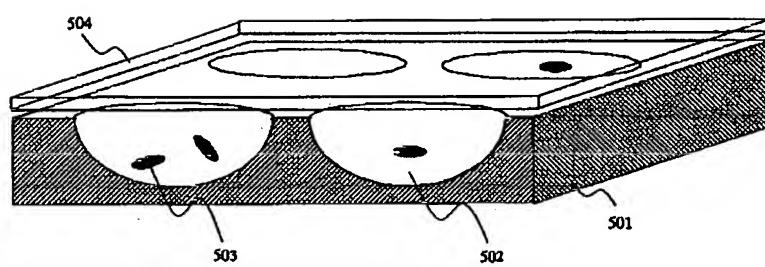
【図4】



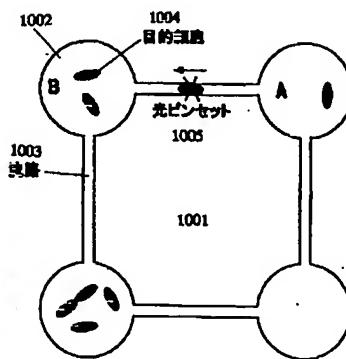
【図9】



【図5】

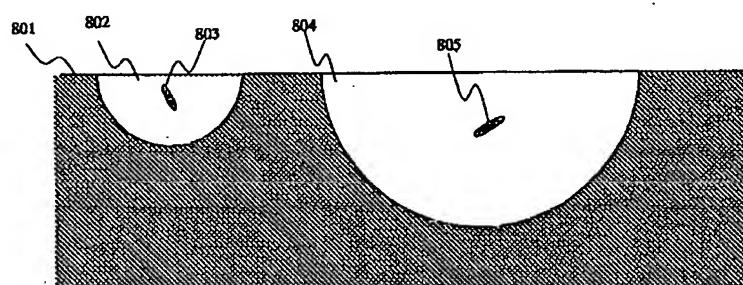


【図10】

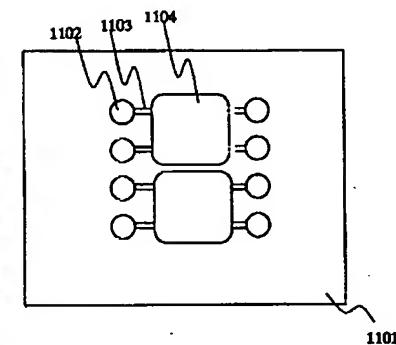


(11) 02-153260 (P2002-153260A)

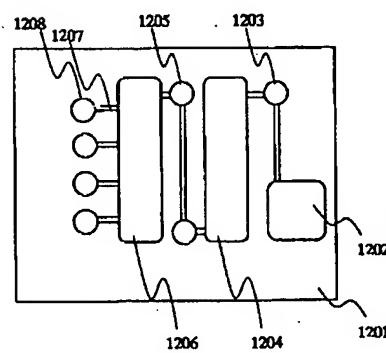
【図8】



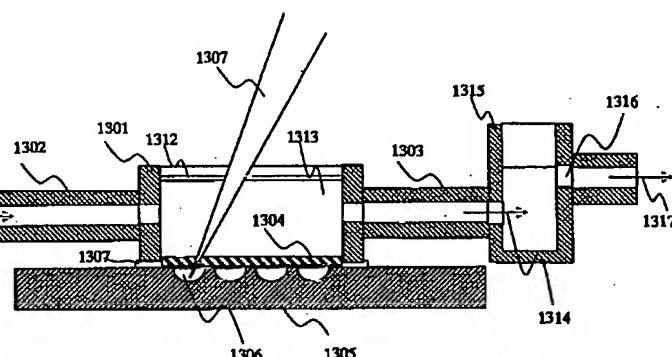
【図11】



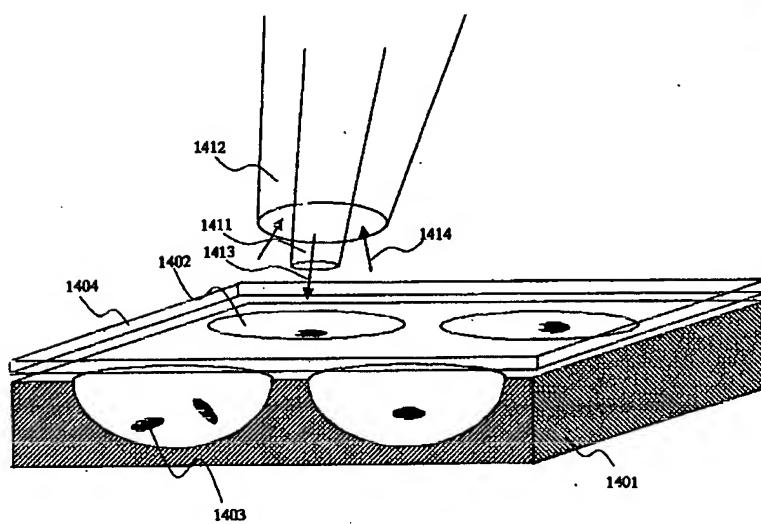
【図12】



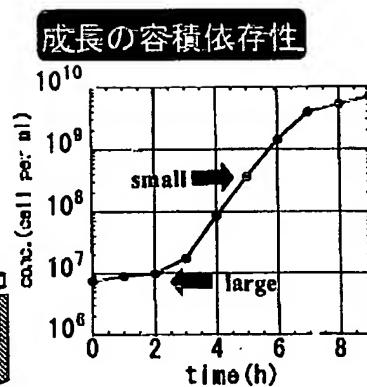
【図13】



【図14】

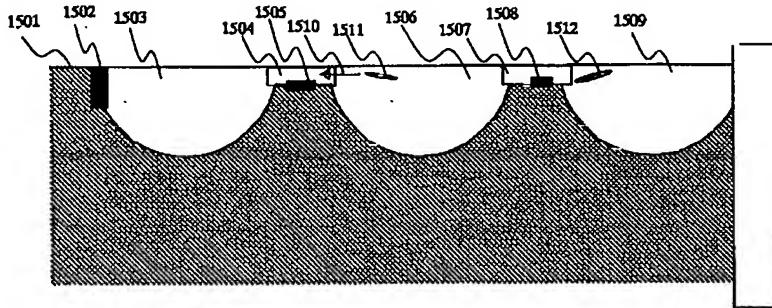


【図18】

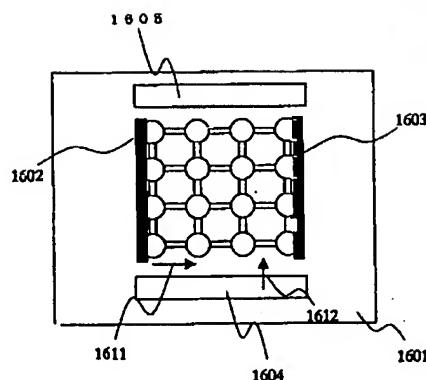


(単2) 02-153260 (P2002-153260A)

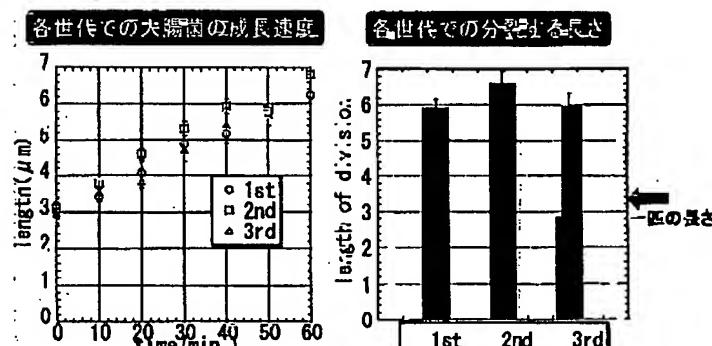
【図15】



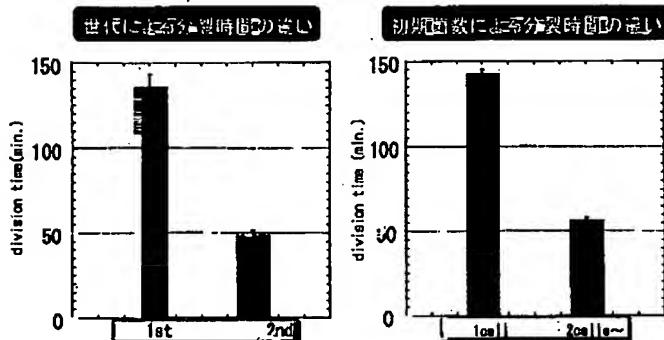
【図16】



【図17】



【図19】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7  
C 12 M 1/42

識別記号

F I  
C 12 M 1/42

(参考)

(72) 発明者 井之上 一平  
埼玉県大宮市佐知川1499-8(72) 発明者 若本 祐一  
東京都杉並区下高井戸1-1-13-307

(13) 02-153260 (P2002-153260A)

(72)発明者 森口 裕之  
東京都世田谷区代田2-36-20 ハイツ浅  
野101号

Fターム(参考) 4B029 AA02 AA07 AA08 AA09 BB11  
DD06 DF05 DF06 DG06 FA01  
FA04 FA09 GA03 GB02 GB03  
GB06 GB08 GB09 HA05 HA10